

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-107991

(43) 公開日 平成9年(1997)4月28日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/28		7823-4B	C 1 2 Q 1/28	
G 0 1 N 21/76			G 0 1 N 21/76	

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平8-186320	(71) 出願人	594199337 ジョンソン エンド ジョンソン クリニ カル ダイアグノスティックス, インコー ポレイティド アメリカ合衆国, ニューヨーク 14650, ロチェスター, インディゴ クリーク ド ライブ 100
(22) 出願日	平成8年(1996)7月16日	(72) 発明者	マルコム ロバート サマーズ イギリス国, エイチピー21 7エルエイ チ, バッキンガムシャー, アイレスバリ ー, チョーサー ドライブ, 63
(31) 優先権主張番号	9 5 1 4 5 9 4 : 2	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)
(32) 優先日	1995年7月17日		
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学ルミネセンス型分析方法並びにそのための試薬及びキット

(57) 【要約】

【課題】 酵素イムノアッセイにおけるバックグラウンドシグナルを減少させること。

【解決手段】 水性溶媒中でのルミノール又は置換ルミノール及び過ホウ酸塩との反応において適当な触媒を使用し、前記反応によって生じたルミネセンスを検出及び測定する際、前記水性溶媒が、前記過ホウ酸塩中の電子不足ホウ素原子をキレート化するための非ルミネセンス型キレート化剤を含むことを特徴とする化学ルミネセンス型分析方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水性溶媒中でのルミノール又は置換ルミノール及び過ホウ酸塩との反応において適当な触媒を使用し、前記反応によって生じたルミネセンスを検出及び測定する際、前記水性溶媒が、前記過ホウ酸塩中の電子不足ホウ素原子をキレート化するための非ルミネセンス型キレート化剤を含むことを特徴とする化学ルミネセンス型分析方法。

【請求項 2】 前記触媒がペルオキシダーゼ酵素であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記非ルミネセンス型キレート化剤が 2 以上のデンティシティーを有する化合物であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】 キレート環の大きさが 5 員又は 6 員であることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 前記非ルミネセンス型キレート化剤がグリシン又はスルホサリチル酸であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記キレート化剤が、存在するルミノール又は置換ルミノール及び過ホウ酸塩のモル量の 2 ～ 10 0 倍のモル量で存在することを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】 水性溶媒中に過ホウ酸イオンを含み、前記水性溶媒が、前記過ホウ酸イオン中の電子不足ホウ素原子をキレート化するための非ルミネセンス型キレート化剤をさらに含むことを特徴とする試薬。

【請求項 8】 前記非ルミネセンス型キレート化剤がグリシン又はスルホサリチル酸であることを特徴とする、請求項 7 に記載の試薬。

【請求項 9】 前記非ルミネセンス型キレート化剤が試薬中の過ホウ酸塩よりも化学量論的に過剰に存在することを特徴とする、請求項 7 又は 8 に記載の試薬。

【請求項 10】 水溶液中にルミノール又は置換ルミノールを含む第一の試薬と水溶液中に過ホウ酸イオンを含む第二の試薬とを一体又は二以上の部分として含み、前記第二の試薬が前記過ホウ酸イオン中の電子不足ホウ素原子をキレート化するための非ルミネセンス型キレート化剤をさらに含むことを特徴とする、化学ルミネセンス型分析方法に有用なキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生物学的流体中の各種アナライトを検出するための分析及び診断化学法に関する。詳細には、本発明は、化学ルミネセンス型アッセイにおいて有用なシグナル発生性組成物に、該組成物を含有する試験キットに、そして該組成物及び試験キットを使用することができる分析方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ルミネセンス型及びルミノメトリー型のアッセイは、目的のアナライトが存在する結果として発

光を生じるものである。この発光は、一般にはそれが測定又は検出されることによりアナライトの分析が可能となるに十分な時間存続するものである。化学ルミネセンス型シグナルを利用してアナライトを有利に分析することができるアッセイ法には主なものとして数種類ある。

1) タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗原、ハプテン、ホルモン、核酸及びその他生物学的に重要な化合物といった特異的結合性リガンドを直接標識するために化学ルミネセンス型化合物を使用するアッセイ。標識されたリガンドにペルオキシダーゼ及び酸化性物質を添加することにより化学ルミネセンスを検出することができる。

2) 特異的結合性リガンドのための標識としてルミネセンス反応の触媒又はコファクターを利用するアッセイ。例えば、ペルオキシダーゼをリガンドに複合体化させて使用し、化学ルミネセンス型シグナルを提供することができる。

【0003】 3) ペルオキシダーゼ以外の酵素標識が適当な基質に作用することによって得られる生成物を測定するために化学ルミネセンス型反応を利用するアッセイ。この種のアッセイの一例として、ペルオキシダーゼ存在下で過酸化水素を発生させることによりグルコースオキシダーゼ標識化特異的結合性リガンドを測定する方法が挙げられる。

4) 非免疫反応体のアナライトの結果として発生した過酸化水素のような酸化性物質又はペルオキシダーゼのような触媒を測定するための非イムノアッセイ。このようなアッセイ法のさらなる詳細については、米国特許第 4, 729, 950 号明細書 (K r i c k a r a) 及びその中に引用されている刊行物のような広範囲にわたる文献に記載されている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】一般に、ルミネセンス型反応に関与する過酸化水素源は過ホウ酸塩であり、その過酸化作用の基質はルミノールのような 2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジンジオンである。水溶液中でルミノールと過ホウ酸塩を混合すると低レベルの自然発光が観測される。このような「バックグラウンド」発光は、ルミノールの酸化を制御して得られる光を測定して反応の終点を決定する化学系 (例、化学ルミネセンス型イムノアッセイ) においては望ましくないものである。従って、酵素イムノアッセイを設計するにはこのような「バックグラウンド」発光をできる限り減少させることが重要である。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明によると、水性溶媒中でのルミノール又は置換ルミノール及び過ホウ酸塩との反応においてペルオキシダーゼ酵素のような適当な触媒を使用し、その反応によって生じたルミネセンスを検出及び測定する際、該水性溶媒が、該過ホウ酸塩中の

電子不足ホウ素原子をキレート化するための非ルミネセンス型キレート化剤を含むことを特徴とする化学ルミネセンス型分析方法が提供される。

【0006】さらに本発明によると、水性溶媒中に過ホウ酸イオンを含み、該水性溶媒が、該過ホウ酸イオン中の電子不足ホウ素原子をキレート化するための非ルミネセンス型キレート化剤をさらに含むことを特徴とする、化学ルミネセンス型分析方法に有用な試薬が提供される。さらに本発明によると、水溶液中にルミノール又は置換ルミノールを含む第一の試薬と水溶液中に過ホウ酸イオンを含む第二の試薬とを含み、該第二の試薬が該過ホウ酸イオン中の電子不足ホウ素原子をキレート化するための非ルミネセンス型キレート化剤をさらに含むことを特徴とする、化学ルミネセンス型分析方法に有用なキットが提供される。

【0007】本発明のキットの第一の試薬と第二の試薬とは一緒に又は別個に提供されることができ、後者の場合には、使用前に混合されるか、又はルミネセンス型反応の他の化合物へ同時に若しくは逐次的に添加される。蛍光分光分析法でルミノール／過ホウ酸塩溶液を分析することにより、関与している分子の一部は溶液中に錯体として共存していることが示された。錯体形成の確からしい機構は、電子不足の過ホウ酸塩のホウ素原子がルミノールによってキレート化されているというものである。本発明者らは、形成された錯体が不安定であり、しかも発光を伴う分解によってバックグラウンドルミネセンスに寄与しているものとする。

【0008】ここで本発明者らは、ルミノール／過ホウ

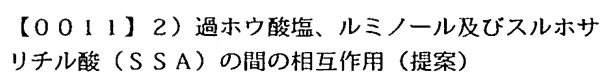
酸塩溶液のバックグラウンドルミネセンスを、適当な分子形状を有する非ルミネセンス型キレート化剤、すなわち過ホウ酸イオンにおける電子不足ホウ素原子をキレート化するための非ルミネセンス型キレート化剤を添加することによって、低減できることを見出した。本発明者らは、添加されたキレート化剤が過ホウ酸塩との結合についてルミノールと競争することにより、不安定なルミノール／過ホウ酸塩錯体の形成が最小限に抑えられるものとする。

【0009】二種の好ましいキレート化剤を用いたバックグラウンドルミネセンスを低減するものと考えられる本発明による機構を、下記に提案した相互作用経路1及び2に示す。経路1におけるキレート化剤はグリシンであり、また経路2におけるキレート化剤はスルホサリチル酸（SSA）である。どちらの相互作用経路においても、ルミノールは、過ホウ酸イオンの電子不足ホウ素原子に酸素原子及び窒素原子を介してゆるく結合することにより不安定な過ホウ酸塩との錯体を形成する。キレート化剤（経路1ではグリシン、経路2ではSSA）の存在下では、これらのキレート化剤が上記錯体からルミノールを置換するのに適した分子形状を有するため、代わりとなる別の錯体が形成される。このため、本発明者らは、バックグラウンドルミネセンスを実質的に低減できるものとする。

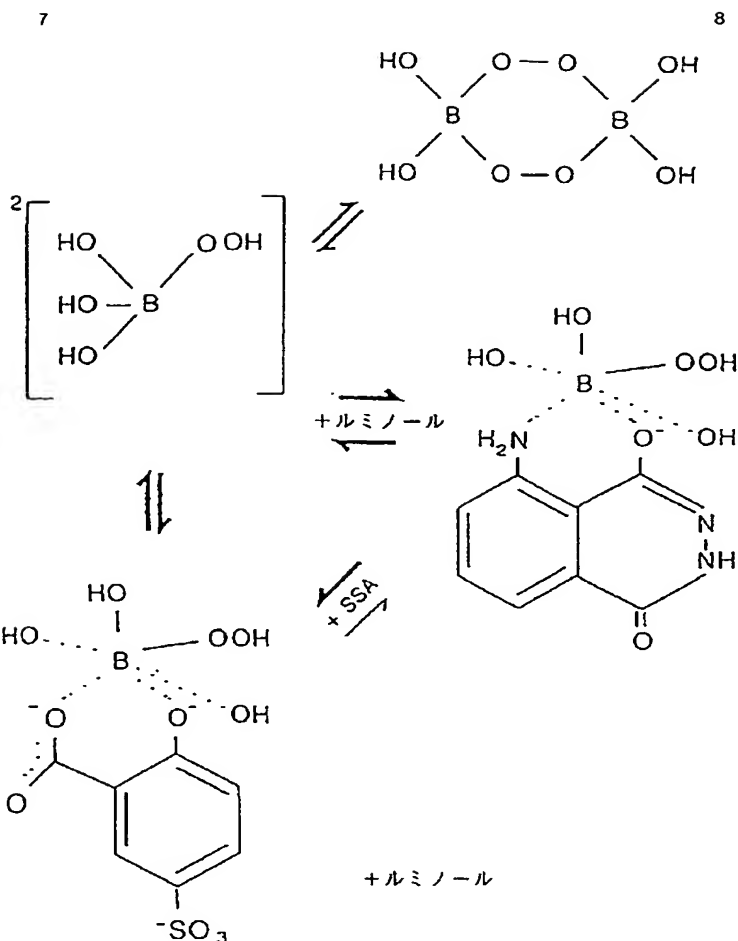
1) 過ホウ酸塩、ルミノール及びグリシンの間の相互作用（提案）

【0010】

【化1】



【化2】



【0013】本発明の方法は、ペルオキシダーゼのような適当な触媒を用いて水性溶媒中でルミノール又は置換ルミノール及び過ホウ酸塩と反応させた後にそのルミネ

30 センスを検出し測定するものであれば、いずれの化学ルミネセンス分析法に対しても何ら特別な制限もなく適用することができる。触媒はペルオキシダーゼ酵素であることが好ましい。この酵素は標識性物質として周知であり、また免疫学的反応や核酸ハイブリダイゼーション技法に基づくアッセイ法で広く用いられている。例えば、ペルオキシダーゼを標的特異的結合性試薬により標的に結合させることができ、そのペルオキシダーゼが結合した標的を単離し、水性溶媒中でルミノール及び過ホウ酸塩と反応させる。この水性溶媒中のルミノール又は置換

40 ルミノールはシグナル試薬と呼ばれる。

【0014】本明細書中の用語「標的特異的結合性試薬」とは、分析対象の標的に対して特異的に結合しうる物質を意味する。標的には生理学的に活性なペプチド、ホルモン、核酸及び類似物質が含まれる。分析対象の標的が抗原として作用しうる場合には、抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、等を含む）が標的特異的結合性試薬となりうる。分析対象の標的が核酸である場合には、その相補的（一本鎖）核酸又は核酸フラグメントが標的特異的結合性試薬とな

50

りうる。

【0015】本発明におけるキレート化剤としては、適当な分子形状を有するいずれの非ルミネセンス型キレート化剤、すなわち過ホウ酸イオンにおける電子不足ホウ素原子をキレート化するいずれの非ルミネセンス型キレート化剤でも使用することができる。好適なキレート化剤は、配位座数又はデンティシティー(denticity)が2以上である化合物である。好適な結合配置は二座配位であり、中でもキレート環の大きさが5員又は6員であるものが特に好ましい。これらの系の内部の結合について、少なくとも一つの配位子基は陰性電荷を有することが好ましい。多座配位子又は巨大環状配位子は過ホウ酸塩が脱離する可能性を低下させるので、好ましい系となる。好適なキレート化剤はグリシン及びスルホサリチル酸(SSA)であるが、他にも使用できるものはある。典型的なシグナル試薬中に好適に存在するキレート化剤の濃度は4～15ミリモル/Lの範囲内にあるが、この濃度は他のシグナル試薬成分によって多少は変動する。キレート化剤は、シグナル試薬中の過ホウ酸塩及びルミノールの両方よりも化学量論的に過剰に存在することが好適である。典型的なシグナル試薬では、キレート化剤は、試薬中に存在するルミノール及び過ホウ酸塩のモル量の2～10倍のモル量で存在する。

【0016】本発明の分析方法に用いられ且つそのシグナル試薬中に存在する水性溶媒は、一般には水又は緩衝液である。好適な緩衝液には、生化学反応に通常用いられる緩衝液が含まれ、具体的にはリン酸系緩衝液やホウ酸系緩衝液が挙げられる。ホウ酸系緩衝液及び過酸化水素の存在下では経路 1 及び 2 に記載した錯体が形成されうることに着目できる (J. Flanagan et al., J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1651, 1989; B.N. Chernyshov, Russian J. Inorg. Chem., 35(9), 1333, 1990)。緩衝液の pH は 5 ~ 12、好ましくは 7 ~ 11 の範囲にあることが好適である。5 未満の pH 値はペルオキシダーゼ酵素の至適 pH 範囲を外れているため、得られるルミネセンスは低下する。12 よりも高い pH 値もこの酵素の至適範囲を外れているが、この場合には、ペルオキシダーゼの活性によらない比較的強いルミネセンス、すなわち非特異的ルミネセンスをもたらしてしまう。

【0017】好ましい触媒はペルオキシダーゼ酵素であるが、MP 11 (ミクロペルオキシダーゼ) のようなポルフィリンをはじめとした他の触媒を使用してもよい。標識性物質として用いられるペルオキシダーゼ酵素は、西洋ワサビの塩基性イソ酵素 (西洋ワサビペルオキシダーゼ又は HRP) であることが好適である。好適な西洋ワサビペルオキシダーゼのイソ酵素には、Sigma Chemical, Poole, Dorset から市販されているタイプ VI 及びタイプ IX が含まれるが、本発明ではタイプ VI を使用することが好ましい。

【0018】標的・特異的結合性試薬とペルオキシダーゼ酵素の間の結合 (すなわち、結合性試薬に酵素を標識すること) は、適当ないずれの方法によっても達成することができる。結合性試薬とペルオキシダーゼ標識は、M. Brinkley, Bioconj. Chem., 3, p. 2, (1992) に記載されている方法又は同様な技法によって直接結合して一緒にすることができる。別法として、標的・特異的結合性試薬にビオチン基のような第一の化学基を導入した後、その第一の化学基と反応する第二の化学基、例えばアビジン又はストレプトアビジン残基を含有するペルオキシダーゼと反応させることで、結合性試薬を間接的に標識化してもよい。

#### 試薬組成

##### 化合物

ホウ酸	57.5
四ホウ酸ナトリウム	17.5
過ホウ酸ナトリウム	2.00
クエン酸三ナトリウム	4.65
クエン酸	2.15
塩化カリウム	100.0
3-クロロ-4-ヒドロキシアセトアニリド	0.15
ルミノールナトリウム	1.00
グリシン	0~15.00

【0023】グリシン濃度を高くするにつれて、バック

【0019】本発明において使用するルミノールはルミノールナトリウム (sodium luminol) であることが好適である。用いる過ホウ酸塩は過ホウ酸ナトリウムであることが好ましい。これは、ペルオキシダーゼ酵素の基質である過酸化水素の発生源として存在する。

【0020】シグナル試薬は、米国特許第 4,842,997 号及び同第 5,279,940 号明細書に記載されているもののような化学ルミネセンスを増強することができる化合物を含有することが好ましい。本発明においては、(過ホウ酸塩由来の) 過酸化水素からペルオキシダーゼを介してルミノールに至る電子移動を促進し且つ増強作用を示しうるものであればいずれのエンハンサーでも使用することができる。好適なエンハンサーとして、4-ヨードフェノール、4-プロモフェノール、4-クロロフェノール、4-フェニルフェノール、2-クロロ-4-フェニルフェノール、6-ヒドロキシベンゾチアゾール、4-[4'-(2'-メチル)チアゾリル]フェノール、4-[2'-(4'-メチル)チアゾリル]フェノール、4-(2'-ベンゾチアゾリル)フェノール、3-(10-フェノチアジル)-n-プロピルスルホネート及び 3-クロロ-4-ヒドロキシアセトアニリドが挙げられる。ペルオキシダーゼによるルミノールと過酸化水素の間の反応を好適なエンハンサーの存在下で起こさせると、該酵素による酸化速度がエンハンサーによって高められる。

【0021】ルミノールとの競争反応のためにシグナル試薬に含まれる非ルミネセンス型キレート化剤に加えて、望ましくない金属イオンの除去や別の目的のために、他のキレート化剤を含有させてもよい。

#### 【0022】

【実施例】本発明を下記の実施例によってさらに説明する。これらの結果は、図 1 及び図 2 にグラフで示されている。

##### 実施例 1

クエン酸と 3-クロロ-4-ヒドロキシアセトアニリド (化学ルミネセンスエンハンサー) を含有するホウ酸系緩衝液中、pH 8.5 においてルミノール過ホウ酸ナトリウムにグリシンを添加した。

##### 濃度 (ミリモル / 1 L の水)

57.5
17.5
2.00
4.65
2.15
100.0
0.15
1.00
0~15.00

グラウンドの化学ルミネセンスの低下が認められた。グ

リシン濃度が4ミリモル/Lを上回ると、バックグラウンド光の出力はその初期レベルの約40%において安定化した。250 $\mu$ Lの化学ルミネセンス組成物に約100アトモル(10<sup>-16</sup>モル)の西洋ワサビペルオキシダーゼを添加することによって触媒したルミネセンスには、グリシンの存在による影響はなかった。むしろ、グリシンの存在によりシグナル/ノイズ比が増加するため有用となる(図1を参照のこと)。ルミネセンスの測定は、「Amerlite」(登録商標: Johnson & Johnson Clinical Diagnostics Limited (J&JCDL), Amersham, UK の分析装置)を用いて白色のマイクロタイターウ

零TSH 標準による  
光シグナル「A」  
(反復測定20回)

平均値 標準偏差 変動係数

グリシン不含	4.11	0.601	14.6%
5ミリモル/L グリシン	2.34	0.351	15.0%

【0026】\*アッセイ感度は、零標準の光シグナルよりも(零標準の20個の反復測定で得られた)標準偏差の2倍分高い値に相当するTSH濃度として定義した。グリシンを含有すると、非特異的バックグラウンド化学ルミネセンスが低下するため、零標準のシグナルの低下が観測された。その結果、第一のアッセイと第二のアッセイの標準間のシグナル比(B/A比)が増加した。これら二つの標準間の投与一応答特性が線形であると仮定した統計分析から、TSHの検出下限値(アッセイ感度)はグリシンの存在によって0.0023から0.0014ミリ国際単位/リットルに向上したことが示された。このことは、低濃度のTSHを分析することができ

エルで実施した。

#### 【0024】実施例2

実施例1に記載したグリシンを含まない又は5ミリモル/L含有する化学ルミネセンス組成物に代わって、J&JCDL (Amersham, UK) より市販されている「Amerlite」TSH-30 超高感度イムノアッセイキット(TSHはヒトチロイド刺激性ホルモンである)における化学ルミネセンス試薬を使用した。公開されているアッセイプロトコルによって以下の結果が得られた。

#### 【0025】

##### 【表1】

0.1130mIU/L の TSH 標準による 平均光シグナル 「B」	B/A 比	アッセイ感度* (mIU/L TSH)
--	-------	------------------------

62.62	15.24	0.0023
57.77	24.69	0.0014

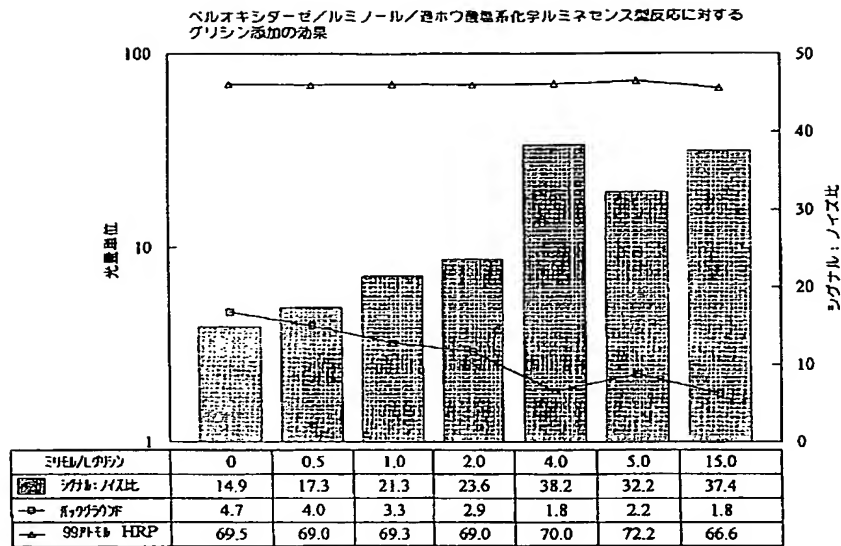
るアッセイ能力が高くなっていること、すなわちこの種の試験における顕著な利点を意味している。他のアッセイ性能変数には、グリシンの添加による影響はなかった(図2を参照のこと)。

#### 【図面の簡単な説明】

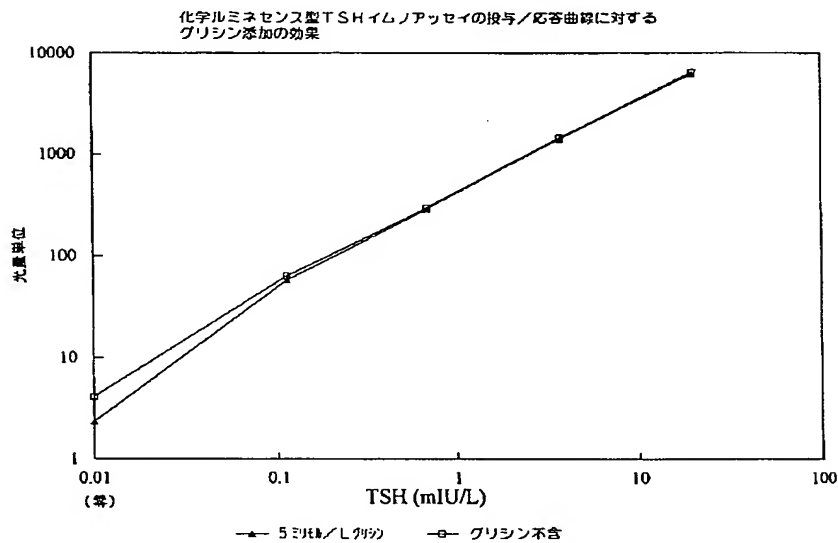
【図1】実施例1におけるバックグラウンドルミネセンスとシグナル/ノイズ比に対するグリシン添加による効果を示すグラフである。

【図2】実施例2におけるTSHイムノアッセイの投与一応答曲線に対するグリシン添加による効果を示すグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者    グラハム    デリスル    イヤーウッド  
イギリス国、ロンドン    エヌ11    2ティ  
エックス、バウンズ    グリーン、ウォーウ  
ィック    ロード、テュークスバリー    コー  
ト、9

(72)発明者    トレーシー    ミシェル    ブース  
イギリス国、エイチピー9    1エーゼッ  
ト、バッキンガムシャー、チェシャム、ホ  
ワイト    ヒル、153

BEST AVAILABLE COPY



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**